



(19) **SU** ⁽¹¹⁾ **1 646 258** ⁽¹³⁾ **A3**
(51) МПК⁶ **C 07 C 311/38, G 01 N 33/50, C 07 D 295/26**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО
ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ СССР

(21), (22) Заявка: 4667842/04, 08.02.1989

(46) Дата публикации: 10.02.1996

(56) Ссылки: Авторское свидетельство СССР N 1419108, кл. C 07C 143/80, G 01N 33/573, C 07D 295/22, 1985.

(71) Заявитель:

Институт биохимии АН ЛитССР,
Институт молекулярной генетики АН СССР

(72) Изобретатель: Палайма А.И.,

Бутенас С.Ю., Талайките З.А., Недоспасов А.А.

(73) Патентообладатель:

Институт биохимии Литовской АН

(54) 5-АМИНОНАФТАЛИН-1-СУЛЬФАМИДЫ В КАЧЕСТВЕ ДЕТЕКТИРУЕМЫХ ГРУПП СУБСТРАТОВ ДЛЯ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ПЕПТИДАЗ

(57)

Изобретение касается сульфамидов, в частности

5-аминонафталин-1-сульфамида, замещенного R₁ и R₂, где R₁-H, R₂-C₁-C₃-алкил, изо-C₃-C₄-алкил, трет, бутил, амил, бензил, циклогексанил, C₂H₄OH, C₂H₄OCH₃, C₂H₄-O-C₂H₅ или R₁=R₂=C₂-C₅-алкил или

"NR₁R₂"-N(CH₂)₆, которые могут быть

использованы в качестве детектируемых групп субстратов для флуоресцентного анализа пептидов. Цель - создание более эффективных веществ указанного класса. Синтез ведут реакцией соответствующего амина с

5-фталимидонафталинсульфохлоридом в среде ацетона с последующей обработкой гидразингидратом при кипячении в среде

метанола. Выход, %, т. пл., °C, брутто ф-ла:

1) 84, 204 - 208, C₁₁H₁₂N₂SO₂; 2) 77, 130 - 133, C₁₂H₁₄N₂SO₂; 3) 93, 115 - 118, C₁₃H₁₆N₂SO₂; 4) 91, 178 - 182, C₁₃H₁₆N₂SO₂; 5) 85, 138 - 139, C₁₄H₁₈N₂SO₂; 6) 92, 213 - 214, C₁₄H₁₈N₂SO₂; 7) 93, 233 - 234, C₁₆H₂₀N₂SO₂; 8) 80, 180 - 184, C₁₇H₁₆N₂SO₂; 9) 77, 140 - 144, C₁₂H₁₄N₂SO₂; 10) 91, 111 - 115, C₁₃H₁₆N₂SO₃; 11) 93, 79 - 82, C₁₄H₁₈N₂SO₃; 12) 95, 104 - 107, C₁₄H₁₈N₂SO₂; 13) 80, 143 - 144, C₁₆H₂₂N₂SO₂; 14) 70, 106 - 110, C₁₆H₂₀N₂SO₂. Новые вещества позволяют увеличить относительную интенсивность флуоресценции и расширить ассортимент детектируемых групп субстратов. 4 табл.

SU 1 646 258 A3

A3 1 646 258 SU



(19) **SU** ⁽¹¹⁾ **1 646 258** ⁽¹³⁾ **A3**
(51) Int. Cl.⁶ **C 07 C 311/38, G 01 N 33/50,**
C 07 D 295/26

STATE COMMITTEE
FOR INVENTIONS AND DISCOVERIES

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4667842/04, 08.02.1989

(46) Date of publication: 10.02.1996

(71) Applicant:

Institut biokhimii AN LitSSR,
Institut molekularnoj genetiki AN SSSR

(72) Inventor: Palajma A.I.,

Butenas S.Ju., Talajkite Z.A., Nedospasov A.A.

(73) Proprietor:

Institut biokhimii Litovskoj AN

(54) **5-AMINONAPHTHALENE-1-SULFAMIDES AS SUBSTRATE DETECTABLE GROUPS FOR PEPTIDASE ANALYSIS BY FLUORESCENCE**

(57) Abstract:

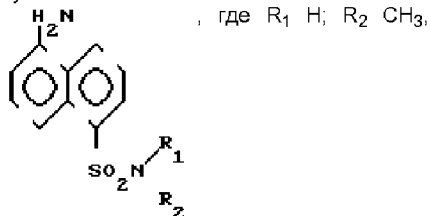
FIELD: organic chemistry. SUBSTANCE: synthesis is carried out by reaction of corresponding amine with 5-phthalimidonaphthalene sulfochloride in acetone medium followed by treatment with hydrazine hydrate at boiling in methanol medium. The yield, %, m. p. C, empirical formula: 1) 84; 204-208; $C_{11}H_{12}N_2SO_2$; 2) 77; 130-133; $C_{12}H_{14}N_2SO_2$; 3) 93; 115-118; $C_{13}H_{16}N_2SO_2$; 4) 91; 178-182; $C_{13}H_{16}N_2SO_2$;

5) 85; 138-139; $C_{14}H_{18}N_2SO_2$; 6) 92; 213-214; $C_{14}H_{18}N_2SO_2$; 7) 93; 233-234; $C_{16}H_{20}N_2SO_2$; 8) 80; 180-184; $C_{17}H_{16}N_2SO_2$; 9) 77; 140-144; $C_{12}H_{14}N_2SO_2$; 10) 91; 111-115; $C_{13}H_{16}N_2SO_3$; 11) 93; 79-82; $C_{14}H_{18}N_2SO_3$; 12) 95; 104-107; $C_{14}H_{18}N_2SO_2$; 13) 80; 143-144; $C_{16}H_{22}N_2SO_2$; 14) 70; 106-110; $C_{16}H_{20}N_2SO_2$. EFFECT: increased relative fluorescence intensity, enlarged detectable groups of substrates. 4 tbl

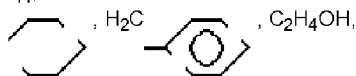
S U 1 6 4 6 2 5 8 A 3

S U 1 6 4 6 2 5 8 A 3

Изобретение относится к химии аминафталинсульфокислот, а именно к новым замещенным 5-аминафталин-1-сульфидами общей формулы I



C₂H₅, C₃H₇ изо-C₃H₇, изо-C₄H₉, трет-C₄H₉, C₅H₁₁,



в качестве детектируемых групп субстратов для флюоресцентного анализа пептидаз.

Целью изобретения является изыскание в ряду аминафталинсульфокислот новых соединений, позволяющих при использовании их в качестве детектируемых групп увеличить относительную интенсивность флюоресценции и расширить ассортимент детектируемых групп субстратов.

П р и м е р 1. 5-фталимидонафталин-1-пентилсульфамид.

13 мл (0,11 моль) пентиламина и 14 мл триэтиламина растворяют в 500 мл ацетона, добавляют в течение 10 мин 37,1 г (0,1 моль) 5-фталимидонафталин-1-сульфонилхлорида и перемешивают при 20°C 4 ч. Ацетон отгоняют при пониженном давлении, осадок заливают 1 л воды и через 20 ч отсасывают продукт. Промывают водой, сушат, перекристаллизовывают из метанола и получают 41,4 г (выход 98%) хроматографически и аналитически чистого продукта с т.пл. 155-157°C, R_f = 0,71 (алуфол, диэтиловый эфир-бензол, 1:1).

Найдено, С 65,54; Н 5,26; N 6,67; S 7,39.

C₂₃H₂₂N₂SO₄.

Вычислено, С 65,39; Н 5,25; N 6,63; S 7,59.

Аналогично получают другие замещенные 5-фталимидонафталин-1-сульфамиды.

П р и м е р 2. Аминафталин-1-пентилсульфамид.

4,23 г (0,01 моль) 5-фталимидонафталин-1-пентилсульфамиды заливают 50 мл метанола, прикапывают 0,5 мл (0,01 моль) гидразингидрата и кипятят 4,5 ч. Метанол отгоняют, остаток экстрагируют 2x20 мл кипящего хлороформа, экстракт упаривают и остаток перекристаллизовывают из метанола. Получают 2,19 г (выход 75%) хроматографически и аналитически чистого продукта с т.пл. 97-98°C, R_f 0,53 (алуфол, хлороформ-этилацетат, 1:1).

ПМР-спектр (δ ДМСО) м.д. 0,66 (CH₃); 1,20 (CH₂); 2,75 (CH₂).

Найдено, С 61,46; Н 6,89; N 9,43; S 10,54.

C₁₅H₂₀N₂SO₂.

Вычислено, С 61,62; Н 6,89; N 9,58; S 10,96.

Аналогично получают другие замещенные 5-аминафталин-1-сульфамиды. Их физико-химические характеристики

приведены в табл. 1. Соединения формулы I представляют собой желтые кристаллические вещества. Для доказательства преимуществ новых соединений определены их относительные интенсивности флюоресценции.

Установление относительной интенсивности флюоресценции. Спектры снимают на спектрофлюориметре "Hitachi MFG-4" (Япония) в относительном режиме при чувствительности 100. Относительную интенсивность флюоресценции рассчитывают по формуле

$$J_5 = \frac{J}{c \cdot 10^5} \cdot A, \text{ где } J \text{ высота полосы}$$

эмиссии, мм;

c концентрация, моль/л;

A соотношение максимальной чувствительности прибора и использованной чувствительности.

Для

5-аминафталин-1-пентилсульфамид (соединение 9 в табл. 2) получают

$$J_5 = \frac{104 \cdot 100}{20,8} = 4,991 \cdot 100$$

$$4,991 \cdot 100$$

Измерение флюоресценции

5-аминафталин-1-циклогексилсульфамид. 0,003675 г

5-аминафталин-1-циклогексилсульфамид растворяют в 10 мл 95%-ного этилового спирта, 0,4 мл этого раствора разбавляют 10 мл фосфатного буфера с pH 7,2 (0,067 M) и снимают спектр. Концентрация измеряемого раствора 4,978 · 10⁻⁵ моль/л, оптическая плотность при длине волны λ 350 нм 0,220; J 122 нм; I₅ 24,5.

Спектры остальных соединений представлены в табл. 2, измерены по этой же методике. Сравнение проводят с известными замещенными аминафталинсульфамидами 1 и 2 из табл. 2.

Применение смеси

5-аминафталин-1-сульфамидов в качестве детектируемых групп субстратов при определении ферментов.

Методика 1. Синтез 5-аргиниламинафталин-1-сульфамидов.

К раствору 7 г карбобензоксигаргина в 40 мл ДМФ приливают при -10°C полученный при -30°C и выдержанный при 20°C в течение 40 мин раствор 2 мл SOCl₂ в 20 мл ДМФА, перемешивают 30 мин при 4°C, охлаждают до -20°C, добавляют раствор смеси 5-аминафталин-1-сульфамидов в 20 мл ДМФА (15 соединений по 1 ммоль каждого; соединения и их количества указаны в табл. 3), вливают 3 мл триэтиламина, перемешивают 4 при 4°C и 12 ч при 20°C, добавляя триэтиламин до слабощелочной реакции; приливают 300 мл этилацетата и 400 мл гексана, осадок промывают смесью этилацетат-гексан, растворяют в смеси бутанол-вода, верхний слой отделяют, водный экстрагируют бутанолом. Бутанольные вытяжки промывают 5% -ным NaHCO₃, 10%-ным KHSO₄, упаривают досуха, заливают 80 мл 2,5M HBr в CH₃COOH, через 1,5 ч добавляют 1200 мл диэтилового эфира, осадок отфильтровывают, промывают эфиром и сушат.

Методика 2. Смесь солей аргиниламинафталинсульфамидов, полученную по методике 1, растворяют в

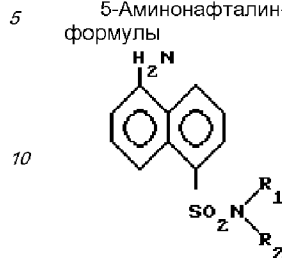
концентрации 7,0 о. е./мл ($\lambda = 300$ нм) в 0,05 трис-HCl буфере (pH 7,4). К 2 мл раствора добавляют 10 мл трипсина (или другого фермента) в концентрации, обеспечивающей гидролиз 1% аргиниламинонафталинсульфамидов за 10 мин, перемешивают, инкубируют 10 мин; при 37°C добавляют 0,6 мл смеси этилацетат-гексан (2:1), перемешивают, верхний слой отделяют, упаривают и разделяют ВЭЖХ на колонке СДС-C-18 при 40 °С элюацией 0,05М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (35% - >> 58% линейный градиент за 20 мин) и ацетонитрила с задержкой градиента 6,5 мин. Детекция при 340 нм. Появление всех 15 аминафталинсульфамидов в элюате с различными временами выхода показывает, что все они могут быть использованы в качестве детектируемых групп субстратов при определении как одного фермента, так и их смесей. Времена выхода приведены в табл. 4 по порядку их увеличения.

Таким образом, соединения формулы I обладают более высокой относительной интенсивностью флюоресценции (14,6-25,8) по сравнению с аналогом (8,7-13,1). Они все могут быть использованы в качестве

детектируемых групп субстратов при определении ферментов, так как обладают различными временами выхода.

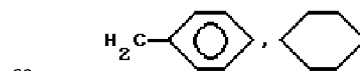
Формула изобретения:

5-Аминафталин-1-сульфамиды общей формулы



15 где R₁ - H;

R₂ - CH₃, C₂H₅, C₃H₇, изо-C₃H₇, изо-C₄H₉, трет-C₄H₉, C₅H₁₁,



25 C₂H₄OH, C₂H₄OCH₃, C₂H₄OC₂H₅, или R₁ = R₂ = C₂H₅, C₃H₇, или NR₁R₂ = N(CH₂)₆.

в качестве детектируемых групп субстратов для флюоресцентного анализа пептидаз.

25

30

35

40

45

50

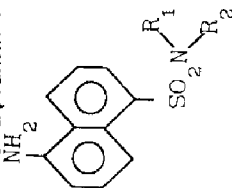
55

60

-4-

Таблица 1

Характеристики 5-аминонафталин-1-сульфамидов



Соединение	R ₁	R ₂	Выход, %	Температура плавления, °С	R _f *	Брутто-формула	Данные элементного анализа (найденно/вычислено), %				ПМР-спектр (δ, м.д. ДМСО) R ₁ , R ₂
							C	H	N	S	
1	H	CH ₃	84	204-208	0,28	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ SO ₂	55,86 55,91	5,18 5,12	11,60 11,85	13,42 13,57	2,38 (CH ₃)
2	H	C ₂ H ₅	77	130-133	0,45	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ SO ₂	57,70 57,58	5,63 5,64	11,30 11,19	12,88 12,81	0,83 (CH ₃), 2,72 (CH ₂)
3	H	C ₃ H ₇	93	115-118	0,49	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ SO ₂	59,57 59,07	6,26 6,10	10,73 10,60	12,08 12,13	0,64 (CH ₃), 1,27 (CH ₂), 2,71 (CH ₂)
4	H	изо-C ₃ H ₇	91	178-182	0,47	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ SO ₂	59,12 59,07	6,28 6,10	10,63 10,60	11,94 12,13	0,83 (CH ₃), 3,22 (CH)
5	H	изо-C ₄ H ₉	85	138-139	0,52	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ SO ₂	60,64 60,41	6,41 6,52	10,25 10,06	10,99 11,52	0,67 (CH ₃), 1,48 (CH), 2,46 (CH ₂)
6	H	трет-C ₄ H ₉	92	213-214	0,43	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ SO ₂	60,47 60,41	6,50 6,52	10,29 10,06	11,51 11,52	1,00 (CH ₃)
7	H		93	233-234	0,38	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ SO ₂	63,31 63,13	6,61 6,62	9,25 9,20	10,02 10,53	1,20 (CH ₂) 2,89 (CH)
8	H		80	180-184	0,52	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ SO ₂	65,38 65,36	5,24 5,16	8,78 8,97	10,40 10,26	3,95 (CH ₂) 7,10 (C ₆ H ₅)
9	H	C ₂ H ₄ OH	77	140-144	0,56**	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ SO ₂	54,13 54,12	5,27 5,30	10,60 10,52	11,99 12,04	2,77 (CH ₂) 3,25 (CH ₂) 4,52 (OH)

S U 1 6 4 6 2 5 8 A 3

SV 8929491 US

Продолжение табл. 1

Соединение	R ₁	R ₂	Выход, %	Температура плавления, °C	R _f *	Брутто-формула	Данные элементного анализа (найденно/вычислено), %				ПМР-спектр (δ, м.д., ДМСО) R ₁ , R ₂
							C	H	N	S	
10	H	C ₂ H ₄ OCH ₃	91	111-115	0,35	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ SO ₂	55,91 55,70	5,79 5,75	10,00 9,99	11,23 11,44	2,90 (CH ₂) 3,01 (CH ₃) 3,22 (CH ₂)
11	H	C ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	93	79-82	0,42	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ SO ₂	57,05 57,13	6,17 6,16	9,70 9,52	10,59 10,89	0,94 (CH ₃) 2,97 (CH ₂) 3,26 (CH ₂)
12	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	95	104-107	0,69	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ SO ₂	60,24 60,41	6,53 6,52	10,17 10,06	11,49 11,52	0,92 (CH ₃) 3,24 (CH ₂)
13	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	80	143-144	0,64	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ SO ₂	62,75 62,72	7,19 7,24	9,30 9,14	10,37 10,46	0,67 (CH ₃) 1,38 (CH ₂) 3,11 (CH ₂)
14	NH ₁ R ₂ = =N(CH ₂) ₆		70	106-110	0,76	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ SO ₂	63,22 63,13	6,59 6,62	9,33 9,20	10,33 10,53	1,44 (CH ₂) 3,23 (CH ₂)

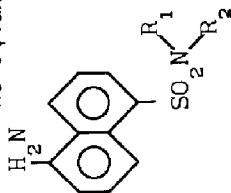
* Хлороформ-этилацетат (2:1)

** Этилацетат-метанол (9:1).

SU 1646258 A3

Таблица 2

Флюоресценция 5-аминонафталин-1-сульфамидов



Пример	R ₁	R ₂	c · 10 ⁵ , моль/л	λ _м , нм	J, мм	J/c · 10 ⁻⁵
1	NR ₁ R ₂ =N(CH ₂) ₅ 		5,050	560	66	13.1
2			5,156	568	45	8.7
3	H	CH ₃	4,496	555	80	14.6
4	H	C ₂ H ₅	4,979	550	95	19.1
5	H	C ₃ H ₇	4,998	568	104	20.8
6	H	изо-C ₃ H ₇	4,906	568	117	23.9
7	H	изо-C ₄ H ₉	4,977	549	97	19.5
8	H	трет-C ₄ H ₉	5,040	547	130	25.8
9	H	C ₅ H ₁₁	4,991	547	104	20.8
10	H		4,978	549	122	24.5
11	H		4,995	556	92	18.4
12	H	C ₂ H ₄ OH	5,114	548	93	18.2
13	H	C ₂ H ₄ OCH ₃	4,795	555	88	18.4
14	H	C ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	4,867	549	87	17.9
15	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	5,168	557	90	17.4
16	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	5,031	553	100	19.9
17	NR ₁ R ₂ =N(CH ₂) ₆		5,105	556	97	19.0

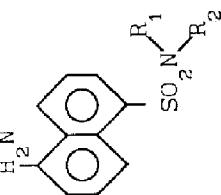
Примечания. D₃₅₀ – оптическая плотность при длине волны 350 нм;

λ_м – максимум полосы флюоресценции.

Спектры сняты в растворах фосфатного буфера (0.067 М, pH 7.2).

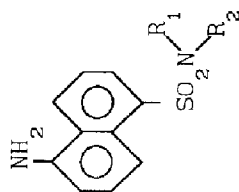
Таблица 3

5-Аминонафталин-1-сульфамиды, использованные в синтезе



R ₁	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R ₂	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	изо-C ₃ H ₇	изо-C ₄ H ₉	трет-C ₄ H ₉	C ₅ H ₁₁	C ₆ H ₁₃	C ₇ H ₁₅	C ₈ H ₁₇
Количество, г	0,24	0,25	0,26	0,26	0,28	0,28	0,29	0,30	0,31	0,31
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
		C ₂ H ₄ OH	C ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	C ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇
	0,31	0,27	0,28	0,29	0,28	0,28	0,29	0,30	0,31	0,31

Таблица 4



Соединение	R ₁	R ₂	Время, мин
1	H	C ₂ H ₄ OH	1,7
2	H	CH ₃	2,3
3	H	C ₂ H ₄ OSCH ₃	2,6
4	H	C ₂ H ₅	3,3
5	H	C ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	4,0
6	H	изо-C ₃ H ₇	5,0
7	H	C ₃ H ₇	5,2
8	H	трет-C ₄ H ₉	6,6
9	H	изо-C ₄ H ₉	8,0
10	H		9,1
11	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	9,2
12	H		11,0
13			12,1
14			14,0
15	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	15,7